Lane Medical Library

Aus dem Laboratorium des Milchamts der Stadt München.
(Vorstand: Veterinärrat G. Rühm).

Die mikroskopische Untersuchung der Milch auf Keimgehalt mit besonderer Berücksichtigung des Nachweises von Galteiter.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Alois Zenz
appr. Tierarzt aus München

München 1934
Buchdruckerei Fr. Ant. Prantl, München

Aus dem Laboratorium des Milchamts der Stadt München.
(Vorstand: Veterinärrat G. Rühm).

Die mikroskopische Untersuchung der Milch auf Keimgehalt mit besonderer Berücksichtigung des Nachweises von Galteiter.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Tierärztlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Alois Zenz
appr. Tierarzt aus München

München 1934
Buchdruckerei Fr. Ant. Prantl, München

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent:

Professor Dr. Wilhelm Ernst

Meiner lieben Braut!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154014_0146

Bestimmung des Keimgehaltes der Milch.

In Deutschland wurde früher die Keimzahl der Milch in wissenschaftlichen Instituten hauptsächlich durch eine indirekte Methode, das Plattenverfahren ermittelt. Erst in den letzteren Jahren ging man aus praktischen Gründen zur direkten Keimzählung mit Hilfe des Mikroskops über. Die Anregung dazu ging von Amerika aus, wo ein besonders einfaches auch für Nichtbakteriologen, wie Molkereifachleute usw. geeignetes Verfahren gefunden wurde.

Nach Boysen (3) und Demeter (5) besteht die Überwachung der Trinkmilchversorgung in Amerika in regelmäßigen Untersuchungen und Wertbestimmungen der Milch und deren Herstellung. Unter diesen Untersuchungsmethoden nimmt die bakteriologische Kontrolle eine besondere Stellung ein und zwar ist es die Keimzählung, deren Einführung am meisten zur Verbesserung der Milchversorgung beigetragen haben soll. Der Vorzug der Keimzählung liegt darin, daß die Zahl der Bakterien in der Milch ein ausgezeichnetes Bild von der Geschichte der Milch gibt. Die Keimzahl gibt Aufschluß, ob die Milch sorgfältig gewonnen wurde, oder ob sie nachlässig behandelt worden ist. Je nach der Sorgfalt, die bei der Gewinnung angewandt wurde, wird die Milch verschieden gut und haltbar sein. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, Milchklassen verschiedener Güte einzurichten und zu bestimmen. Es ist auch klar, daß für größere Sorgfalt, die größeren Arbeitsaufwand bedeutet, wirtschaftliche Vorteile gerechtfertigt sind.

Die beste und teuerste Milch ist die „Certified Milk". Sie darf, abgesehen von Tuberkelbazillenfreiheit, höchstens 10 000 Keime in 1 ccm enthalten. Die übrige Milch teilt man in drei Klassen:

Klasse A darf nicht über 100 000 Bakterien in 1 ccm
„ B „ „ „ 300 000 „ „ 1 „

besitzen. Milch mit höherem Bakteriengehalt gehört in Klasse C und darf nur in erhitztem Zustand verkauft werden. Für das platte Land sind die Vorschriften etwas gemildert.

Die Keimzahl wird, wie eingangs erwähnt, durch direkte mikroskopische Zählung der in Vollmilch enthaltenen Bakterien bestimmt.

Für die Qualitätsbeurteilung der Milch ist aber nicht nur die Bestimmung der Keimzahl an und für sich, sondern besonders der Nachweis von Krankheitskeimen (z. B. Mastitisstreptokokken) von Bedeutung; besonders dann, wenn es sich auch um die Prüfung der Milch vom Standpunkte der Lebensmittelpolizei aus handelt.

Die erste Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. Mai 1931 enthält Bestimmungen über das Gewinnen und in den Verkehrbringen galteiterhaltiger Milch.

Nach § 3, e ist es verboten für andere zu gewinnen oder in den Verkehr zu bringen: Milch von Kühen, die an einer entzündlichen

Erkrankung der Haut des Euters oder des Euters selbst leiden, im Falle des gelben Galtes jedoch nur dann, wenn die Milch sinnfällig verändert ist.

Nach § 4, 2 ist es verboten, von Kühen, die an gelbem Galt leiden, Milch, die, ohne sinnfällig verändert zu sein, lediglich mikroskopisch nachweisbaren Eiter enthält, für andere zu gewinnen oder in den Verkehr zu bringen, sofern sie nicht nach Reinigung mit Zentrifugen und ausreichender Erhitzung zu Milcherzeugnissen verarbeitet wird.

In Molkereien, in denen die Milch regelmäßig durch direkte Keimzählung auf ihre Qualität beurteilt wird, ist die Möglichkeit geboten, galteiterhaltige Milch als solche zu erkennen, vorausgesetzt, daß bei der angewandten Untersuchungsmethode eine gewisse Sicherheit für den Nachweis des Galteiters gegeben ist.

Veterinärrat Rühm, Vorstand des Milchamtes der Stadt München, schlug mir vor, eine Zusammenstellung der derzeitig gebräuchlichen direkten Keimzahlbestimmungsmethoden zu bringen und Untersuchungen darüber anzustellen, ob im Hinblick auf die Bestimmungen des Deutschen Milchgesetzes mit Hilfe der direkten Zählmethode bezw. durch unmittelbare mikroskopische Untersuchung der Vollmilch die Streptokokkenmastitis erfaßt und ob auf die Zentrifugierung und Untersuchung des Sediments im Interesse der Vereinfachung des Verfahrens verzichtet werden kann. Ferner sollte durch vergleichende Untersuchungen die Häufigkeit des Vorkommens von Galtstreptokokken und Leukozyten in Vollmilch, Rahm, Magermilch und Sediment festgestellt werden.

Die gebräuchlichsten Keimzählmethoden.

Schrifttum.

Die Keimzählung kann, wie schon eingangs erwähnt, nach zwei Methoden vorgenommen werden:

1. der indirekten, dem sogenannten Plattenverfahren,
2. der direkten mikroskopischen Zählung.

Indirekte Zählmethoden von Bakterien in Flüssigkeiten.

Beim Plattenverfahren ergeben sich nach Scholz (29) je nach dem Nährsubstrat, der Bebrütungstemperatur und der Dauer der Bebrütung recht große Schwankungen.

Nach Klein (15) ist Voraussetzung für die Anerkennung der Plattenzählung, daß jeder Keim zu einer Kolonie auswächst und daß jede Kolonie aus einem einzigen Keime hervorgegangen ist. Diese Voraussetzung trifft niemals zu; selbst dann nicht, wenn das verflüssigte Nährsubstrat nach dem Hinzufügen der zu untersuchenden Flüssigkeit gründlich durchgeschüttelt worden ist, damit auch wirklich jeder einzelne Keim für sich allein zu einer Kolonie auswächst und diese wieder nicht allzu dicht aneinander liegen, andernfalls wird das eigentliche Zählen ungemein erschwert und ungenau. Beim Ausgießen des beimpften Agars (Gelatine)

bleiben am Röhrchen immer einzelne Keime haften, so daß auf der Platte weniger Kolonien auftreten, als tatsächlich Keime in dem gegebenen Substrat sind. Dieser Fehler kann aber vermieden werden, wenn man die zu untersuchende Milch oder Milchverdünnung in die Kulturschalen gibt und erst dann den verflüssigten Nährboden zugießt und hierauf durch Schwenken Milch und Nährboden gut verteilt.

I. Die Vornahme der Zählung der gewachsenen Kolonien erfolgt frühestens nach 24 Stunden und zwar auf dreierlei Art:

1. Durch die totale Auszählung mit der Lupe bei einem Keimgehalt unter 100 Kolonien;
2. Durch die Partialauszählung mit der Lupe bei mehr als 100 und weniger als 1500 Kolonien;
3. Durch die Partialauszählung mit dem Mikroskop bei mehr als 1500 Kolonien.

Sommerfeld (36) verdünnt 5 ccm Milch mit Kochsalzlösung 1:1000 und bringt eine zur Aussaat bestimmte Menge in eine leere Kulturschale, darüber wird verflüssigter Agar oder Gelatine gegossen und nach Bebrütung gezählt.

Frost (9) benutzt die sogenannte Kleinplattenmethode: 0,05 ccm Milch wird auf sterilem Objektträger mit einigen Tropfen Nähragar vermischt und auf 4 qcm verteilt. Die Bebrütung erfolgt in feuchter Kammer. Die Auszählung geschieht unter dem Mikroskop.

II. Die besten Resultate gibt das von Demeter (5) beschriebene Verfahren: Er stellt mittels einer Anzahl 1,1 ccm fassender Pipetten in je 99 ccm steriles, destilliertes Wasser enthaltende Verdünnungsflaschen Milchverdünnungen im Verhältnis 1:10:100 usw. bis zu 10 000 000 her und gibt von diesen Verdünnungen bestimmte Mengen (0,1 bezw. 1 ccm) in die Kulturschalen. Nach Zugabe des Nährbodens und Verteilung der Milch in diesem erfolgt die Bebrütung entweder 2 Tage lang bei 37° oder 5 Tage lang bei 20° C. Die meisten Kolonien erhält man, wenn man 5 Tage lang bei 20° und 2 Tage lang bei 37° brütet. Die Methode wird vom Milchwirtschaftlichen Reichsverband empfohlen (vergl. 16).

Direkte Zählmethoden von Bakterien in Flüssigkeiten.

Analog der Methode, die Blutkörperchen zahlenmäßig zu bestimmen, versuchte man auch die Bakterien in der Zählkammer auszuzählen. Auf diese Weise zählten Hueppe, Lafar (17), Winterberg (43), Liebreich (20), Troester (38) und Wamòscher (41); Wright (44) bringt die Bakterien in Beziehung zu den in 1 cmm Blut befindlichen roten Blutkörperchen, Fries (8) zu einer Bierhefeaufschwemmung. Sommer (35) gibt eine Modifikation dieser Methode an. Klein und Hehewert benutzten nach Klein (14) nicht mehr die Zählkammer, sondern zählten die gefärbten Bakterien.

Alle angegebenen Verfahren eignen sich aber nicht für die Zählung der Milchkeime, da die Milchfettkügelchen störend wirken.

Die von Skar (34) für Keimzahlbestimmung in der Milch an-

gegebene Methode besteht in einer direkten Zählung von Bakterien und Leukozyten in demselben Präparat unter Anwendung von einem besonderen Ocularmikrometer.

Eine bestimmte Menge Milch, 1/50 ccm mit gefärbten Bakterien, Zellen usw. wird über eine Fläche von bestimmter Größe (24 × 20 mm) verteilt und abhängig davon, ob viele oder wenige z. B. Bakterien zugegen sind, wird eine größere oder kleinere Fläche von dem Objekt betrachtet. 1/12 Ölimmersion und gewöhnliches Ocular I wird angewandt.

Das Verfahren ist in Kürze folgendes:

Man bringt 3,5 ccm Karbolmethylenblau + 0,5 ccm einer 30%igen Natronlauge in ein Kultur- oder Reagenzglas, spritzt darauf mit Hilfe einer Pipette schnell 10 ccm Milch hinein, schüttelt das Röhrchen gut, wärmt es am besten in einem Wasserbade von höchstens 70° C und nahe bei dieser Temperatur 5—10 Minuten lang. Man entnimmt darauf mit einer Glasrohrpipette $^1/_{50}$ ccm von der gefärbten Milch und mit Hilfe einer feinen Platinnadel wird sie auf das Objektglas mit dem abgegrenzten Quadrat verteilt. Das Präparat wird an der Luft getrocknet; es wird nicht fixiert, auch nicht entfettet oder abgespült, da man dadurch sowohl Zellen als auch Bakterien entfernen kann. Man betrachtet es nun mit der Ölimmersion.

Das Okularmikrometer besteht aus einer Glasplatte mit feinen eingeritzten Strichen. In der Mitte ist sie mit einem kleinen Quadrat a versehen, das so groß ist, daß es genau 1 : 400 qmm großes Quadrat auf dem Objekt deckt, wenn man dieses durch $^1/_{12}$ Ölimmersion und z. B. Ocular Nr. I unter Anwendung einer bestimmten Tubuslänge betrachtet. Außer diesem Quadrat a hat man Quadrat b, das $^3/_{400}$ qmm auf dem Objekt repräsentiert. Die beiden Quadrate sind von 2 Kreisen umgeben, von welchen der innere $^{10}/_{400}$ qmm und der äußere $^{12,5}/_{400}$ qmm darstellt. Der äußere Kreis nimmt das ganze Gesichtsfeld ein. Endlich ist das ganze Feld mit 2 einander kreuzenden Strichen in 4 Teile (Quadranten) geteilt. Die Milchmenge, welche auf dem Objektglas verteilt ist, ist so abgepaßt, daß 1 Bakterie (Zelle) in den verschiedenen Flächen folgende Zahlen darstellt:

$^1/_4$ von Quadrat a	40 000 000
$^1/_2$ von Quadrat a	20 000 000
das ganze Quadrat a	10 000 000
$^1/_4$ von Quadrat b	8 000 000
$^1/_2$ von Quadrat b	4 000 000
das ganze Quadrat b	2 000 000
Kreis c	1 000 000
Kreis d	800 000.

Abhängig von der gewünschten Genauigkeit zählt man Bakterien z. B. in 10—20 Gesichtsfeldern oder mehr, indem man, wie gesagt, das Quadrat oder den Kreis wählt, der für die Bakterienmenge paßt. Das Objekt wird bei der Zählung auf bestimmte Weise verschoben. Darauf wird durch leichte Multiplikation die Zellenmenge leicht und schnell ausgerechnet.

In einem jeden Mikroskop, in dem das Ocularmikrometer angewandt werden soll, muß die Tubuslänge ein für allemal mit Hilfe eines Objektmikrometers bestimmt werden, damit man stets die bekannte Gesichtsfeldgröße überblickt. Die Fläche auf dem Objektglas ist 480 qmm (24 mm × 20 mm) und davon betrachtet man $^1/_{400}$ qmm d. h. $^1/_{192\,000}$ des ganzen Präparates (480 × 400) und diese sind unter Anwendung von $^1/_{50}$ ccm Milch verfertigt. Man betrachtet also $^1/_{9\,600\,000}$ ccm Milch (480 × 400 × 50). Im Quadrat a übersieht man aber $^1/_{9\,600\,000}$ ccm Milch + Farblösung. Eine Bakterie in dem Quadrat hätte daher 9 600 000 Bakterien pro Kubikzentimeter darstellen sollen, falls die Milch nicht gefärbt und damit ein wenig verdünnt wäre. Die Milch wird aber genau so verdünnt, daß 1 Bakterie 10 000 000 pro Kubikzentimeter darstellt. 9,6 ccm Milch sollten eigentlich 0,4 ccm Farbe zugesetzt werden, wenn dieses zutreffen sollte. Nun werden aber 10 ccm Milch 0,4 ccm Farbe zugesetzt. Es wird dadurch etwas zu wenig verdünnt und die Zahl 10 000 000 wird zu groß; dieser Fehler wird aber absichtlich gemacht, u. a. um den kleinen Fehler, der dadurch entsteht, daß z. B. einige Bakterien beim Ausstreichen der Milch durch die feine Platinnadel entfernt werden, aufzuheben.

Durch den Zusatz von 0,4 ccm Farblösung wurde die Milch im Verhältnis 1 : 25 verdünnt. (10,0 + 0,4 = 10,40; 0,40 : 10,0 = 1 : 25.)

Der Ausgleich erfolgt sonach dadurch, daß man die verdünnte Milch nicht auf 5 qcm sondern nur auf 4,8 qcm ausstreicht.

(5,0 — 4,8 = 0,2; 0,2 : 5 = 1 : 25.)

Bei der Zählung wählt man am besten eine Fläche im Ocularmikrometer, die im Durchschnitt 10 Bakterien enthält. Je mehr Bakterien, desto genauer wird das Resultat. Man zählt jedes Glied in einer Bakterienkette und jedes einzelne in einem Bakterienhaufen. Wenn man das Ocularmikrometer von Skar nicht zur Verfügung hat, kann man die Zählung nach den Angaben Breeds (4) machen, muß aber das Ergebnis mit 2,5 multiplizieren, weil $^2/_{100}$ ccm Milch auf 5 qcm bezw. $^1/_{100}$ ccm Milch auf 2,5 qcm ausgebreitet wurden.

Als eine einfache und zuverlässige Methode zur direkten mikroskopischen Zählung von Bakterien in der Milch hat sich die soeben erwähnte von Robert S. Breed (4) erwiesen.

Diese wird in U.S.A. bei der Überwachung der Trinkmilchversorgung durchgeführt.

Nach gutem Durchmischen der Milch werden 0,01 ccm mit Hilfe einer Kapillarpipette auf einen sauberen Objektträger gebracht. Der Milchtropfen wird unter Benutzung einer reinen steifen Nadel gleichmäßig über die Fläche von 1 qcm verteilt. Dies geschieht am besten dadurch, daß man den Objektträger auf eine Führungsplatte legt, die in Quadratzentimeter eingeteilt ist. Die Markierungen, die durch das Glas scheinen, dienen als Führung. Nach dem Ausbreiten sollen die Präparate an einem warmen Platze getrocknet werden und zwar auf einer ebenen Fläche, wo sie vor Fliegen und Staub geschützt sind. Um merkliches Bakterienwachstum zu verhindern, muß das Trocknen in 5—10 Minuten beendet sein; jedoch soll übergroße Hitze vermieden werden, da sonst die Milchhäutchen brechen können und dann bei der späteren Behandlung abblättern.

Nach dem Trocknen werden die Objektträger in Xylol getaucht oder in irgend ein anderes Fettlösungsmittel und zwar so lange, bis das Fett entfernt ist (mindestens 1 Minute). Dann läßt man abtropfen und trocknet wieder. Darauf werden die Präparate ein oder mehrere Minuten lang in 90 % denaturierten Alkohol und dann in eine Lösung von Löfflers Methylenblau gebracht.

Die Präparate können in der Farblösung gelassen werden, bis sie überfärbt sind. Sie müssen dann mit Wasser abgespült und im Alkohol wieder etwas entfärbt werden. Diese Entfärbung dauert von wenigen Sekunden bis zu einer Minute oder länger. Man muß während dieser Zeit die Präparate beobachten, damit die Entfärbung nicht zu weit geht. Richtig gefärbte Präparate sollen einen schwach bläulichen Hintergrund zeigen. Schlecht gefärbte Präparate können ohne Schaden ganz entfärbt und dann wieder gefärbt werden. Nach dem Trocknen können die Präparate gleich untersucht oder beliebig lange aufbewahrt werden.

Das Mikroskop muß so eingestellt werden, daß jedes Gesichtsfeld einem gewissen Bruchteil eines Quadratzentimeters entspricht. Diese Einstellung ist einfach, wenn ein Objektmikrometer mit Hundertstelmillimeterteilung zur Hand ist. Zur Einstellung legt man das Objektmikrometer auf den Mikroskoptisch und bringt dann durch Auswahl des Oculares oder Einstellen des Tubusauszuges oder durch beides den Durchmesser des gesamten Gesichtsfeldes auf 0,205 mm. Bei dieser Einstellung entspricht jedes Gesichtsfeld des Mikroskopes einer Fläche von ungefähr $^1/_{8000}$ qcm (genauer $^1/_{8022}$ qcm). Das bedeutet, daß $^1/_{20\,000}$ Teil der Trockensubstanz eines Kubikzentimeters Milch in jedem Gesichtsfelde sichtbar ist. Wenn daher nur die Bakterien von einem Felde gezählt werden, sollte, die gefundene Zahl mit 300 000 multipliziert, die geschätzte Zahl der Bakterien je Kubikzentimeter ergeben. In der Praxis wird jedoch mehr als ein Gesichtsfeld untersucht, man multipliziert dann den Durchschnitt der gezählten Gesichtsfelder mit 300 000. Beträgt der Durchmesser des Gesichtsfeldes 0.205 mm, so überblickt man, wie schon erwähnt, ein Gesichtsfeld von $^1/_{8000}$ qcm; in diesem Falle sind mindestens 30 Gesichtsfelder zu zählen. Ist aber der Durchmesser 0.160 mm, so überblickt man nur $^1/_{5000}$ qcm im Gesichtsfeld. Man zählt dann die Keime in mindestens 50 Gesichtsfeldern. Bei Einhaltung dieser Regel hat man die Gewähr, daß man jedesmal im Ganzen mindestens $^1/_{100}$ qcm

durchgemustert hat, was im Interesse eines einheitlichen Ergebnisses der Untersuchung zu berücksichtigen ist.

Newmann (Klimmer 16) hat das Breed'sche Verfahren insoferne vereinfacht, als er die Entfettung, Fixierung, Färbung und Differenzierung gleichzeitig vornimmt. Er benützt hiezu die nachgenannte Flüssigkeit, in die der lufttrockene Ausstrich einmal kurz eingetaucht wird; hierauf folgen Ablaufen der Farblösung und Lufttrocknung, Wasserspülung, Trocknen und zuletzt die Untersuchung mit Ölimmersion.

Newmann'sche Flüssigkeit:

54 ccm 95%iger Alkohol und 40 ccm technisches Tetrachloraethan werden vermischt und nicht über 70° erwärmt. 1 g gepulvertes Methylenblau wird mit obigem Gemisch übergossen und durch Schütteln gelöst. Hierauf erfolgt nach Abkühlung ein allmählicher Zusatz von 6 ccm Eisessig. Nach dem Durchmischen wird filtriert. Die Lösung ist gut verschlossen aufzubewahren.

Eine Modifikation dieser Methode ist die, daß man anstatt Tetrachloraethan Xylol zur Entfettung verwendet. Der Objektträger wird in die Lösung eingetaucht. Die Gefahr der Überfärbung besteht nicht, wenn auch bis zu einer halben Stunde gefärbt wird. Nach dem Färben wird gründlich getrocknet. Erst dann erfolgt das Abwaschen mit Wasser und Mustern des Präparats mit der Ölimmersion.

Herstellung der Lösung;

Methylenblau medic. pulv.	2 g
Alkohol 95%ig	60 ccm
Xylol	40 ccm
Eisessig	6 ccm

Das Methylenblau wird in warmem Alkohol aufgelöst und nur langsam zugegeben. Hierauf folgt Zugabe von Xylol und Essig. Die Lösung wird filtriert und in dicht verschlossener Flasche aufbewahrt.

Boysen (3) gibt auch ein Verfahren zur Keimzählung zentrifugierter Ausstriche an.

Die Milchproben werden mit der üblichen Vorsicht entnommen und gut durchmischt. Die Röhrchen — 7,5 cm lang, an beiden Seiten offen und aus Glasröhren von 6 mm Durchmesser hergestellt, Inhalt ca. 2 ccm — werden an einem Ende verschlossen und dann mit 2 ccm Milch versetzt. Die Glasgeräte müssen sauber, brauchen aber nicht steril zu sein. Das offene Ende wird mit dem anderen Stopfen verschlossen und die Röhrchen dann in die Zentrifuge gesteckt.

Um den Bodensatz mit der geringsten Störung zu erhalten, entfernt man zunächst den Stopfen am inneren Ende, dem Rahmende. Dann hält man das Röhrchen mit dem Rahmende nach unten, entfernt den Rahm mit einem Draht und gießt die Milch aus. Zuletzt, indem man immer noch das Rahmende nach unten hält, entfernt man den anderen Stopfen, an dem das Sediment klebt. Platten aus gewöhnlichem Fensterglas werden zur Untersuchung benützt. Sie sind ungefähr 5 cm breit und beliebig lang. Flächen von je 4 qcm werden auf diesen Platten mit dem Fettstift folgendermaßen abgeteilt:

29 mm von der einen Längsseite zieht man eine Linie, dann zieht man im Abstand von je 14 mm senkrecht zu der ersteren parallele Linien über die ganze Platte. Man erhält so Flächen von je 2,9×1.4 cm = 4 qcm, mit je einer kleineren Fläche am Rande zur Bezeichnung des Präparates. In jedes der 4 qcm Felder wird 1 Tropfen sterilen Wassers gebracht. Das Sediment, das an dem Außenstopfen des Röhrchens sitzt, wird mit dem Wasser verdünnt über je eines dieser Felder verteilt und ausgestrichen, indem man den Tropfen direkt auf dem Glase abreibt, bis das Sediment auf die Glasplatte übergegangen ist. Wenn dieses sorgfältig getan wird, kann man die kleine Menge verdünnten Sediments, die noch am Stopfen hängen geblieben ist, vernachlässigen. Der Ausstrich wird dann schnell durch gelindes Erwärmen auf einer ebenen Fläche getrocknet und mit Methylenblau gefärbt. Überschüssige Farbe wird mit Wasser abgewaschen und der Ausstrich wieder getrocknet. Die Präparate sind dann zur Untersuchung mit der Ölimmersion fertig.

Will man die Anzahl der Körperzellen oder Bakterien in den Ausstrichen schätzen, dann ist es nötig, das Gesichtsfeld des Mikroskopes zu standardisieren, wie es bei der direkten Zählmethode geschieht Hat das Gesichtsfeld einen Durchmesser von 0,205 mm, dann würden 3000 Felder einen Quadratzentimeter ausmachen, oder 12 000 Felder den ganzen 4 qcm des Ausstriches entsprechen. Das

heißt, daß die Zahl der in einem Felde gesehenen Zellen oder Bakterien mit 12 000 multipliziert werden muß, um die Gesamtzahl der im Ausstrich vorhandenen Zellen oder Bakterien anzugeben. Wenn der Durchmesser des Gesichtsfeldes 0,160 mm ist, dann sind 5000 Felder je Quadratzentimeter und die Zahl der Zellen oder Bakterien muß mit 20 000 multipliziert werden.

Um einen guten Durchschnittswert zu bekommen, muß man wenigstens 30 bezw. 50 charakteristische Felder zählen, wenn es sich um verhältnismäßig geringe Zahlen von Zellen und Bakterien handelt. Sind diese zahlreich, so ist es unnötig genaue Zählungen zu machen.

Vergleich zwischen der indirekten und der direkten Zählmethode.

Nach Breed (4) ergeben sich für die Plattenmethode hauptsächlich folgende Beanstandungen:

1. Nicht alle in der Milch vorhandenen Bakterien wachsen unter den gewählten Bedingungen auf den betreffenden Nährböden.
2. Man kann die Bakterien nicht so verteilen, daß lauter einzelne Kolonien erscheinen und daß die Kolonien aus einzelnen Keimen hervorgegangen sind.
3. Die Zählung kann frühestens nach 24 Stunden angestellt werden.

Die Milch, aus der die Probe stammt, kann man aber nicht so lange aufbewahren, da sie sogleich entweder verkauft oder verarbeitet werden muß.

Die mikroskopische Untersuchung kann dagegen sofort vorgenommen und in kürzester Zeit erledigt werden. Die Art und Verteilung der Keime kann weitgehend bestimmt werden, eine Mitzählung von toten Bakterien fällt dabei kaum ins Gewicht, da diese schnell Zeichen des Verfalls zeigen und alsbald ganz verschwinden.

Das Verhältnis der bei den Plattenverfahren und der direkten mikroskopischen Zählung erhaltenen Werte der Keimzahlen hängt hauptsächlich von der Bebrütungszeit und Bebrütungstemperatur ab. Wird 2 Tage lang bei 37° gebrütet, verhalten sich die Zahlen wie 1:4. Eine fünftägige Bebrütung bei 20° bedingt ein Zahlenverhältnis von 1:2,5. Bei fünftägiger Bebrütung bei 20° und zweitägiger Bebrütung bei 37° verhalten sich die Werte wie 1:2 (16).

Nachweis von Galteiter in der Milch bei der direkten Keimzählung.

Schrifttum.

Mikroskopie der Milch gesunder Tiere.

Nach Ernst (6) und Klimmer (16) kommen in Milch gesunder Tiere mikroskopisch zur Beobachtung:

1. Zellen aus mehrschichtigen Plattenepithellagen.

Ernst führt an: „Bei der intensiven Bearbeitung der Zitze beim Melkakt ist das Vorkommen von Zellen aus den obersten Schichten des Plattenepithels der Außenhaut und des Strichkanals selbstverständlich.“

2. Zylinderepithelien der Zisterne; sie sind längere Zellen mit ovalem Kern und meist zu einer Gruppe verbunden.

3. Zellen aus den sezernierenden Milchgängen und Alveolen. Sie sind meist stark mit Fett beladen und haben ein gelbliches Aussehen (Schaumzellen, Kolostralkörperchen).

4. Leukozyten.

Am häufigsten findet man die polymorphkernigen Leukozyten. Sie sind durch tiefdunkelblaues Aussehen des segmentierten Kernes charakterisiert. Der Zelleib ist meist undeutlich. Die Größe beträgt 12 Mikra.

Außer diesen sind noch die Mononucleären zu erwähnen; sie sind etwa 15 Mikra groß. Der große rundliche Kern zeigt ein netzförmiges Gefüge.

Lymphozyten sind kleine Zellen (10 Mikra) mit großem scharf berandetem rundem Kern, umgeben von einem ganz schmalen zartblau gefärbten Protoplasmasaum.

5. Bei Entartung und Zerfall dieser Zellarten sind die verschiedensten Gebilde zu sehen (Freie Kerne, Nissen'sche Kugeln u. a.).

6. Kunstprodukte. Durch Einschlagen von Luft beim Schütteln der Milch entstehen die sogenannten Häutchen und Bälge, die man früher für verhornte Zellen aus dem mehrschichtigen Plattenepithel des Zitzenkanals ansah.

Nach Seelemann (31) enthält eine normale Milch außerordentlich wenig Zellen. Unter den Kühen mit einwandfreiem Euter gibt es zahlreiche, die so gut wie keine Zellen erkennen lassen. In gesunden Milchen findet man nur ganz vereinzelte Leukozyten, Lymphozyten, spärlich Epithelzellen. Daneben gibt es eine Reihe von Kühen, bei denen der Zellgehalt etwas höher liegt, die Zellen treten in den Gesichtsfeldern mehr hervor. Nach Seelemanns Beobachtungen scheint dies eine Eigentümlichkeit mancher Milchdrüsen zu sein, sie sind etwas „empfindlicher" als andere, sie reagieren „leichter" ohne daß man es mit einer Sekretionsstörung zu tun hat.

Ein physiologisch vermehrtes Auftreten von Zellen in der Milch wird nach Rühm (24, 25) beobachtet bei Kolostralmilch, bei Milch am Ende der Laktationsperiode, bei dauernder Brunst, Milchstauung usw.

Nach Klimmer (16) befinden sich in 1 ccm normaler Milch 500000 Leukozyten. Jensen (13) rechnet damit, daß normale Kuhmilch $^1/_2$—$1^1/_2$ Millionen Leukozyten pro ccm enthält.

Nach Lederer (18) wechselt die Zahl der Zellen in 1 ccm normaler Milch von weniger als 5000 bis 20 Millionen.

Nach Ernst und Seelemann ist es jedoch nicht angebracht eine bestimmte Grenze für den Leukozytengehalt bei normaler Milch festzulegen. Die Schwankungen sind zu groß; auch ist die Reaktionsempfindlichkeit der Drüsen verschiedener Tiere so wechselnd, daß die Feststellung einer Norm hier nur Verwirrung stiften muß, ganz abgesehen davon, daß sich für die Milch, ein Produkt von so wechselnder Zusammensetzung, überhaupt keine bestimmten Grenzwerte feststellen lassen.

Mikroskopie der Galtmilch.

1. Die Zellen:

Unter pathologischen Verhältnissen nimmt die Zahl der Zellen zu, auch tritt eine Verschiebung in ihrem gegenseitigen Zahlenverhältnis ein.

Nach Schumann und Lorenzen (30) kann ganz allgemein gesagt werden, daß bei der Streptokokkenmastitis die polymorphkernigen Leukozyten vorwiegen. Ihre Zahl ist jedoch großen Schwankungen unterworfen. Quantitativ stehen an zweiter Stelle die Epithelzellen der milchführenden Gänge und der Zisterne sowie Zellzerfallsprodukte, deren Zugehörigkeit zu einer Zellart meistens nicht mehr festzustellen ist. Alle übrigen Zellarten treten rein zahlenmäßig hinter den erstgenannten Zellen zurück.

Für die Diagnose ist das gesamte Zellbild nach Art und Menge heranzuziehen. Solche Feststellungen finden sich auch in vielen älteren Arbeiten.

2. Der Erreger:

Die Diagnose auf gelben Galt ist sicher gestellt, wenn der Nachweis des spezifischen Erregers gelingt.

Nach Seelemann (31) findet man in vielen Fällen den Galtstreptokokkus — Streptokokkus agalactiae — Guillebeau — in mehr oder weniger großer Menge bei den erkrankten Tieren. Nicht selten kommt er aber auch in außerordentlich geringer Anzahl in der Milch vor.

Die Form der Streptokokken in den betreffenden Milchproben ist nicht einheitlich. Früher glaubte man je nach der Länge einen sogenannten Streptokokkus brevis und Streptokokkus longus unterscheiden zu müssen.

Als Diagnostikum für Misch- und Sammelmilch hat Ernst als charakteristisch angegeben: „Die Erreger haben diplokokkenartige Teilglieder, die Kokken drücken sich scheinbar, werden scheibenförmig und sehen im Profil strichähnlich aus, diese Striche stehen quer zur Längsrichtung der Kette (Staketenform). Bald mehr, bald weniger ausgeprägt ist eine feine Hülle um die tierischen Milchstreptokokken gebildet, die manchmal zu einer breiten Schleimkapsel verquillt. Der Endkokkus besonders bei kurzen Ketten ist kugelig bis kolbig angeschwollen.“ Diese Merkmale können fehlen, so daß in solchen Fällen die Stellung der Diagnose durch die mikroskopische Untersuchung allein auf Schwierigkeiten stößt und kulturelle Untersuchungen usw. angestellt werden müssen.

Gminder (10) weist schon darauf hin, daß Länge und Form der Ketten, die Anordnung der einzelnen Teilglieder außerordentlich wechseln können. Bald sieht man im Ausstrich nur Diplokokken, bald Streptokokken von 4—10—100—1000 Gliedern. Oft kann man unter kurzen Streptokokken vereinzelt längere und unter längeren wieder ganz kurze Ketten sehen.

Nach Seelemann dürften Staketformen ein Zeichen für längeres Bestehen der Krankheit oder für das Vorliegen stärkerer Milchveränderungen sein, während die intakten Formen mehr bei

Anfangsstadien oder zur Zeit des Frischmelkstadiums bei leichteren Milchveränderungen vorkommen.

3. Verhältnis der Erreger zu den Zellen:

In den ersten Anfängen sind die Leukozyten oft nur spärlich zum Teil sogar in durchaus normaler Menge vorhanden, dennoch kann in Wirklichkeit eine Galtinfektion vorliegen. Im allgemeinen gilt jedoch der Satz Zschokkes „Ohne Eiter kein gelber Galt", wenn auch die Leukozyten und die sonstigen Milchveränderungen in so spärlichem Maße vertreten sind, daß nicht von Eiter im wahrsten Sinne des Wortes gesprochen werden kann.

In vielen Fällen gehen Leukozyten- und Streptokokkenmenge parallel. So sagt Trommsdorff (39) „Von besonderem Interesse ist nun, daß die Vermehrung des Leukozytengehalts der Milch sich fast stets dann findet, wenn gleichzeitig die Milch reich ist an Streptokokken." Bergeys (2) Angaben werden damit bestätigt. Rullmann und Trommsdorff (26) haben in der Hälfte ihrer untersuchten Fälle einen vollständigen Parallelismus zwischen der Menge der Leukozyten und der Menge der Streptokokken in der Milch aus den einzelnen Zitzen beobachtet. In anderen Fällen wiederum war der Parallelismus kein vollständiger.

Rühm (24, 25) hat auch häufig Leukozyten und Streptokokkenmengen im umgekehrten Verhältnis beobachtet, nämlich verhältnismäßig wenig Streptokokken bei gleichzeitig vorhandenem hohen Leukozytengehalt und massenhafte Ausscheidung von Streptokokken bei Anwesenheit nur geringer Mengen Leukozyten. Sodann erwähnt Trommsdorff (40), daß er öfter auch größere Leukozytenmengen ohne größere Bakterienmengen gefunden hat. Die gleiche Beobachtung teilen Rüdiger, Mayr und Wurster (23) mit. Auch sie haben verhältnismäßig hohe Prozentsätze von Milchproben gefunden, die einerseits veränderte Zusammensetzung, aber keine Krankheitserreger aufwiesen. Andererseits fanden sie auch Milchproben mit normaler Zusammensetzung bei Anwesenheit von unter Umständen sehr vielen Krankheitserregern.

Für unsere Untersuchungen ist es auch wissenswert zu erfahren, was im Schrifttum über den Einfluß des Zentrifugierens auf die Verteilung der Keime und Zellen in der Milch enthalten ist.

Seiffert (32) stellte fest, daß beim Zentrifugieren von Milch der größte Teil der Bakterien in den Rahm übergeht, das heißt, daß die Bakterien nicht als schwerere Körper nach außen geschleudert, sondern durch den Auftrieb der spezifisch leichteren Milchkügelchen nach innen gerissen werden.

Scheurlen (28) hat schon 1891 den enormen Unterschied in der Zahl der in den Rahm und der in den Bodensatz übergehenden Bakterien nachgewiesen. Die Zahl der in den Rahm übergehenden Bakterien verhielt sich zu den im Bodensatz ausgeschiedenen bei Scheurlen wie 94:1.

Herr und Beninde (12) fanden bei selbsttätigem Aufrahmen der Milch im sogenannten Schwartzschen Aufrahmungsverfahren das Verhältnis 28:1.

Niedestadt (21) ist auf Grund seiner Versuche der Ansicht, daß 75 % der Milchbakterien in den Rahm übergehen und bloß 25 % in Magermilch und Bodensatz bleiben. Russels (27) Ermittlungen zufolge ist der Rahm stets reicher an Bakterien als die zugehörige Vollmilch.

Wilkens (42) konstatiert den Übergang des bedeutend größeren Teils der Bakterien in der Vollmilch in den Rahm bei der Zentrifugierung.

Nach den Versuchen von Backhaus und Cronheim (1) gehen in den Rahm lange nicht so viele Bakterien über wie es bei den Versuchen von Scheurlen und Niedestadt konstatiert worden war. Mit den Resultaten von Backhaus und Cronheim stimmen auch die Befunde von Roht (22) überein.

Skar (34) gibt an, daß man oft in Milch Streptokokken gefunden hat, bei Zählung der Bakterien im Bodensatz aber nur wenig oder keine; wahrscheinlich aus dem Grund, weil sich viele derselben im Rahm befinden. Das Schlimmste ist aber, daß nicht alle Zellen im Bodensatze zu finden sind.

Lentzen (19) führt an, daß er viele Leukozyten in der Rahmschicht von Mastitismilch nach dem Zentrifugieren gefunden hat. Auch Skar hat Leukozyten in großen Mengen in der Rahmschicht nach dem Zentrifugieren normaler Milch gefunden.

Schleudert man den Rahm mit destilliertem Wasser oder 40 % Alkohol aus, so ergibt sich meist ein großer Bodensatz. Dieser besteht zum größten Teil aus Leukozyten und enthält außerdem große Mengen von Bakterien, und was besonders zu bemerken ist, der Bodensatz des Rahms kann große Mengen von Streptokokken enthalten, selbst wenn sie im Zentrifugenbodensatz der Milch nur in geringer Anzahl vorkommen, ja es kommt vor, daß man keine im Bodensatz der Milch findet, aber viele oder relativ viele im Bodensatz des Rahms.

Der Grund, warum viele Streptokokken und Leukozyten im Präparat der Milch, obwohl nur wenige oder vielleicht keine im Zentrifugenbodensatz zu finden sind, dürfte sicher darin zu suchen sein, daß die Leukozyten und Bakterien (Streptokokken) mit Fettkügelchen zusammenkleben, oder, daß sie von letzteren geradezu mit nach oben gefegt werden. Die Leukozyten gehen namentlich deshalb nach der Rahmschicht, weil sie mehr oder weniger Fett enthalten und dadurch das spezifische Gewicht geringer wird. Man kann auch sehen, daß Leukozyten sich nach dem Zentrifugieren in der Milch schwebend halten, da sie ungefähr dasselbe Eigengewicht wie die Magermilch haben.

Besonders bei Untersuchungen der Milch von einzelnen Tieren kann das Erwähnte eine große Rolle spielen, weil Leukozyten, abhängig von vielen Umständen — individuelle Veranlagung der Melktiere, Laktationsperiode, Euterkrankheiten — mehr oder weniger fettgefüllt sein können.

Eigene Untersuchungen.

Methodik.

Als Material zu meinen Untersuchungen wählte ich die am Milchamt der Stadt München zur Untersuchung eingebrachten Milchproben, die mir kostenlos zur Verfügung standen.

Zur Verarbeitung gelangten 64 Proben aus der Mischmilch mehrerer Kühe von Einzelbetrieben sowie 35 Viertelsproben von Einzelkühen. Nur in einem Falle wurde das vermischte Gemelke aus 2 Vierteln einer Kuh untersucht. Die Proben wurden von Beamten des Milchamts teils bei der Einlieferung der Milch an den Sammelstellen, teils in den Gehöften selbst vor dem Melken entnommen.

Technik.

Von den Milchproben wurden kurz nach Einlauf im Institut nach leichtem Anwärmen je 10 ccm in Trommsdorffröhrchen gefüllt und zentrifugiert. Der Bodensatz wurde dann auf übliche Weise mikroskopisch untersucht. Alle Milchen, die dabei auffallende Befunde zeigten (höhere Trommsdorffwerte, Galtstreptokokken usw.) wurden dann von mir einer gesonderten, nachstehend beschriebenen Untersuchung unterzogen.

Nach guter Durchmischung der Milch wurden zunächst die Sinnenproben angestellt um eine etwaige anormale Farbe, Konsistenz oder anormalen Geruch festzustellen. Hierauf wurden den Angaben Breeds folgend mittels einer Haarrohrpipette 0,01 ccm der gut durchmischten Probe entnommen und auf ein 1 qcm großes Feld mit Hilfe einer gebogenen Nadel auf einen Objektträger gleichmäßig ausgestrichen.

Zur Sicherheit sowie zu Vergleichszwecken wurde von jeder Milch auf die gleiche Weise noch ein zweites Präparat angefertigt. Die Präparate wurden an der Luft oder durch vorsichtiges Erwärmen getrocknet. Die Trocknung dauerte etwa 5—10 Minuten. Von derselben Milch wurden wiederum 10,0 ccm in ein Trommsdorffröhrchen eingefüllt und 10—15 Minuten in einer Gerber'schen elektrisch betriebenen Zentrifuge mit ca. 1000 Umdrehungen pro Minute ausgeschleudert. Die Höhe des Sedimentes wurde abgelesen und hinsichtlich Farbe und Aussehen beurteilt.

Durch Drehen des Röhrchens über der Gasflamme wurde der feste Rahmpfropf erwärmt und dadurch verflüssigt. Hierauf wurden aus der verflüssigten Rahmschicht $2 \times$ je $^1/_{100}$ ccm mit der Pipette entnommen. Beide Mengen wurden auf je 1 qcm des Objektträgers ausgestrichen. Nach Abgießen des Rahmes wurde ebenso mit der Magermilch verfahren, also ebenfalls zwei Präparate angefertigt.

Die Pipette wurde jedesmal sofort nach Entnahme der Vollmilch, des Rahms und der Magermilch mit stark verdünnter Natronlauge durchgespült.

Der ganze Bodensatz wurde nach Ausgießen der überstehenden Magermilch mittels völlig zusammengepreßter Platinöse aus den

Trommsdorffröhrchen herausgenommen und je nach Größe entweder auf ein Feld von 4 qcm oder nur 2 qcm mit einem Tropfen Wasser gleichmäßig verrieben und verteilt. Bei unter 0,5 ‰ Sediment wurde ein Feld von 2 qcm benützt. Durch Anwendung einer Führungsplatte war sowohl bei den 1 qcm als auch bei den 2 und 4 qcm großen Feldern die Gewähr gegeben, daß die betreffende Fläche genau eingehalten wurde.

Die Ausstriche wurden ebenfalls durch vorsichtiges Erwärmen auf der Heizplatte langsam getrocknet.

Zur Entfettung kamen die Präparate (Vollmilch-, Rahm-, Magermilchpräparate sowie der Sedimentsausstrich) in Xylol. Nach ungefähr 2—3 Minuten, wenn das Fett vollständig gelöst war, wurde das Xylol vom Objektträger abgegossen und der zurückbleibende Rest auf der Heizplatte völlig zum Verdampfen gebracht. Zur Fixierung wurden die Objektträger ungefähr ebenso lang in Methanol eingestellt. Nach Verflüchtigung des Methanols auf der Heizplatte waren die Präparate zur Färbung reif. Gefärbt wurde zum Teil mit Löfflers Methylenblau mit eventuell nachfolgender Differenzierung überfärbter Präparate mit 96 %igem Alkohol zum Teil mit einer 1 %igen wässrigen Toluidinlösung nach Zaribnicky, zum Teil mit Toluidinblau + Carbolfuchsin, zum größten Teil aber mit wässerigem Thionin nach Ernst durch ca. 3 Sekunden langes Eintauchen. Anfangs wurde auch die Newmannsche Färbung angewandt; sie konnte aber wegen der schlechten Ergebnisse beim Rahmpräparat nicht weiter durchgeführt werden (l. c.).

Nach Abwaschen der überschüssigen Farbe mit Wasser und Trocknung auf der Heizplatte kamen die Präparate zur Untersuchung.

Die Prüfung der Vollmilch-, Rahm- und Magermilchpräparate geschah auf Anregung von Rühm zur raschen Auffindung des Galteiters zunächst mit schwacher Vergrößerung (1:50).

In frischer, reiner Milch gesunder Tiere sieht man dann als Milchplasma hellblau gefärbt mit scharfen, kreisrunden ungefärbten Lücken, die von den Fettkügelchen herrühren. Von den Zellen sieht man nur die Kerne als feine, gleichmäßig verteilte dunklere Einzelpunkte.

Anders ist das Bild, wenn die Milch von galtkranken Tieren stammt oder feine Schmutzteilchen und Bakterienkolonien enthält. Schmutzteilchen sind ohne weiteres an ihrer unregelmäßigen Gestalt und Größe, der Strukturlosigkeit und tiefblauen Färbung erkennbar. Bakterienkolonien besitzen ebenfalls eine unregelmäßige Gestalt, zeigen auch eine intensiv blaue Färbung, sind aber meist kleiner als Schmutzteilchen und lassen eine gewisse Struktur erkennen.

Der einigermaßen Geübte erkennt den Galteiter an der Aneinanderreihung der punktförmigen, dunkelgefärbten Zellkerne zu

verschieden großen, granulierten, gegenüber dem Milchplasma dunkler gefärbten Gebilden, die an Staubkörnchen erinnern. Manchmal sieht man auch zwischen den Kernpunkten feine Fäden verlaufen, wenn der Streptokokkus die Gestalt von langen verschlungenen Ketten hat.

Diese Häufchen wurden dann mit starker Vergrößerung (Ölimmersion) auf etwa darin enthaltene Galtstreptokokken untersucht. Durch Anwendung eines Kreuztisches, hatte ich die Gewißheit, daß der ganze Quadratzentimeter der Untersuchungsfläche $= {}^1/_{100}$ ccm durchmustert wurde und so war die Anzahl der gefundenen Leukozytenhäufchen nur mit 100 zu multiplizieren um den Gehalt von 1 ccm Milch oder Rahm oder Magermilch an solchen Gebilden zu ermitteln. Waren keine Leukozytenhäufchen festzustellen, so wurden unter Zuhilfenahme der Ölimmersionslinse mindestens 30 Gesichtsfelder und mehr durchmustert, um isolierte Galtstreptokokken aufzufinden. Dabei wurde außerdem noch die Zahl sowie die Art der Zellen festgestellt. Da der Durchmesser des Gesichtsfeldes bei Ocular I und Anwendung der Ölimmersionslinse bei bestimmter Tubuslänge auf 0,205 mm eingestellt war (Radius 0,102 mm) betrug die Größe des Gesichtsfeldes $0{,}102 \times 0{,}102 \times 3{,}14 = 0{,}032$ qmm $= {}^1/_{3000}$ qcm.

1 Zelle im Gesichtsfeld entsprach demgemäß 3000 Zellen im ganzen Ausstrich oder 300 000 Zellen in 1 ccm der Untersuchungsflüssigkeit. Da jedoch mehrere Gesichtsfelder durchmustert wurden, war die gefundene Zahl durch die Anzahl der Gesichtsfelder zu dividieren. Durchmustert man bei Anwendung der starken Vergrößerung 30 Gesichtsfelder, so hat man nur ${}^1/_{10\,000}$ ccm Milch überblickt. $\frac{30}{300\,000} = \frac{1}{10\,000}$; bei Anwendung der schwachen Vergrößerung aber überblickt man bei Durchmusterung von 30 Gesichtsfeldern die gesamte ausgestrichene Milchmenge nämlich ${}^1/_{100}$ ccm. Daraus geht hervor, daß im letzteren Falle die Sicherheit des Nachweises von Eiterklümpchen größer wird, weil die durchsuchte Milchmenge wesentlich größer als im ersten Falle ist.

Das Sedimentpräparat wurde gleich mit starker Vergrößerung durchmustert, da eine deutliche Erkennung von natürlich zusammengeballten Eitergebilden wegen Vorhandenseins einer großen Menge durch die Zentrifugalkraft einander genäherter Einzelzellen bei Verwendung der schwachen Vergrößerung nicht möglich war. Es wurde besonders darauf Bedacht genommen, von möglichst auseinanderliegenden Stellen des Ausstriches Gesichtsfelder zu prüfen um so einen Durchschnittswert zu erhalten.

Bei gleichem Gesichtsfelddurchmesser (0,205 mm) entsprach 1 Zelle im Gesichtsfeld = 3000 Zellen im 1 qcm-Ausstrich, 1 Zelle im Gesichtsfeld = 6000 Zellen im 2 qcm-Ausstrich, 1 Zelle im Gesichtsfeld = 12 000 Zellen bei einer Ausstrichfläche von 4 qcm. Die Summe der gefundenen Zellen (Keime) war wiederum durch die Zahl der Gesichtsfelder zu teilen.

Untersuchungsbefunde.

Im Verlaufe von sechs Monaten wurde auf die angegebene Weise eine große Anzahl von Milchen untersucht. Die zusammengefaßten Ergebnisse beziehen sich aber nur auf solche Milchproben, in denen Galteiter mikroskopisch nachgewiesen werden konnte.

TABELLE 1.

Übersicht über den Gehalt an streptokokkenhaltigen Leukozytenkonglomeraten.

Vollmilch,	deren Rahm,	Magermilch,	Sediment,	Fälle
+	+	+	+	27
+	+	+	—	5
+	+	—	+	14
+	—	+	+	2
+	+	—	—	10
+	—	+	—	1
+	—	—	+	12
—	—	+	+	1
+	—	—	—	7
—	+	—	—	1
—	—	—	+	4
—	—	—	—	7

Die 4 noch möglichen Variationen sind nicht vorgekommen.

TABELLE 2.

Übersicht über den Gehalt an freiliegenden Galtstreptokokken ohne Beisein von galtstreptokokkenhaltigen Leukozytenkonglomeraten.

Vollmilch,	deren Rahm,	Magermilch,	Sediment,	Fälle
+	+	—	+	2
+	+	—	—	1
—	+	—	+	2
—	+	—	—	1
—	—	—	+	1

Alle übrigen noch möglichen Variationen bezüglich des Vorkommens von freiliegenden Galtstreptokokken ohne Beisein von galtstreptokokkenhaltigen Leukozytenkonglomeraten waren nicht vertreten.

TABELLE 3.

Zusammenfassung der Übersichten aus Tabelle 2 und 3.

Vollmilch,	deren Rahm,	Magermilch,	Sediment,	Fälle
+	+	+	+	27
+	+	+	—	5
+	+	—	+	16
+	—	+	+	2
+	+	—	—	11
+	—	+	—	1
+	—	—	+	12
—	+	—	+	2
—	—	+	+	1
+	—	—	—	7
—	+	—	—	2
—	—	—	+	5
—	—	—	—	7

Die 3 noch möglichen Variationen kamen nicht vor.

Bei der Untersuchung fällt der Unterschied auf, der sich ergibt, wenn man Galteiter im Zentrifugat und in der Vollmilch bezw. in Rahm oder Magermilch bei Anwendung der starken Vergrößerung im Mikroskope betrachtet.

Durch die Zentrifugalkraft werden im Bodensatz die Eiterkörperchen (polymorphkernige Leukozyten und Galtstreptokokken) mit großer Gewalt aneinandergepreßt, von den Zelleibern ist nicht viel mehr zu sehen. Die Kerne sind zu dunkel gefärbten Massen verklumpt. Die zwischen den Zellen liegenden Galtstreptokokken können durch die angehäuften Zellkerne so verdeckt werden, daß sie sich in manchen Fällen der Auffindung entziehen. Hierdurch wird der mikroskopische Nachweis des Galteiters erschwert, so daß zwar der Nachweis des Eiters, nicht der der spezifischen Eitererreger gelingt. Eine weitere Erschwerung besteht darin, daß Schmutzteilchen (Kuhkot usw.) mit den Eiterkörperchen zusammen ausgeschleudert werden und mit diesen zusammen im Gesichtsfeld eine dunkelgefärbte, oft nicht zu unterscheidende Masse bilden. Durch das Zentrifugieren werden auch andere Keime so z. B. die gewöhnlichen Säurestreptokokken, welche nicht aus dem kranken Euter stammen, mit den Eiterzellen zusammen ausgeschleudert und so in manchen Fällen eine natürliche Verbindung der Keime saprophytischer Herkunft mit den Eiterzellen vorgetäuscht.

Es erscheint daher hier nochmals angebracht auf die Anweisung von Ernst bezüglich der Beurteilung des Sedimentausstriches hinzuweisen (l. c.).

Stellt man ein nach der Methode Breed aus Vollmilch gefertigtes Präparat mit starker Vergrößerung ein, so beobachtet man, daß der Galteiter ein etwas anderes Aussehen hat, als im Sediment.

Die Zellen sind nicht so eng aneinandergepreßt, die Zelleiber erscheinen besser erhalten, die Kerne nicht so sehr zerstückelt und deformiert. Da die Zellen weiter auseinandergerückt sind, lassen sich die dazwischen liegenden Streptokokken vielfach leichter erkennen. Der Unterschied zwischen Galtstreptokokken und saprophytischen Streptokokken läßt sich besser feststellen, weil der natürliche Zusammenhang der Galtstreptokokken mit den Leukozyten besser erkennbar wird und weil man weiß, daß eine künstliche Beeinflussung des Zusammenhanges zwischen den Zellen und Keimen durch das beim Sedimentausstrichverfahren notwendige Zentrifugieren unterblieben ist. Es ist in jeder Weise interessant und lehrreich die Vollmilch selbst zu mikroskopieren und die Untersuchung nicht auf das Sediment zu beschränken.

Untersucht man galteiterhaltige Vollmilch ohne weitere Vorbehandlung, so fällt verschiedentlich die außerordentliche Länge der Galtstreptokokken im Gegensatz zur Länge der Streptokokken im Sedimentpräparat auf. In manchen Präparaten ist das ganze Gesichtsfeld von einer einzigen, ununterbrochenen, zu einem Knäuel verflochtenen Streptokokkenkette ausgefüllt. In einem aus derselben Milch gefertigten Sedimentausstrich erscheinen aber die Streptokokken wesentlich kürzer, was hauptsächlich darauf zurückzuführen sein dürfte, daß die Ketten durch die Zentrifugalkraft zerrissen werden.

Bei der Untersuchung der Rahmpräparate fallen vor allem die zahlreichen Zellen auf, die mit den aufsteigenden Fettkügelchen

beim Zentrifugieren in die Höhe gerissen werden. Auch die zusammengeballten Leukozyten können zum Vorschein kommen; erscheinen aber häufiger noch im Sediment. Die im Rahm vorkommenden, isolierten Galtstreptokokken erscheinen wesentlich kürzer als im Vollmilchpräparat, wohl auch aus demselben Grund, warum sie im Sediment meist in kurzen Ketten zu finden sind. Die Zellkerne erscheinen deformiert und zugespitzt wie im Sediment. Man sieht auch hier den Einfluß der Zentrifugalkraft auf die Zellgestalt.

Die Untersuchung der Magermilchpräparate ergibt, wie nicht anders zu erwarten ist, im Vergleich zur Vollmilch, Sediment und Rahm eine erhebliche Verminderung aller zelligen Elemente, einschließlich der Galtstreptokokken. Man hat den Eindruck, daß die Form der Zellen und Galtstreptokokken besser erhalten geblieben ist als im Sediment und Rahm.

Sammelergebnisse.

Zum Nachweis des Galteiters wurde vor allem der Befund an galtstreptokokkenhaltigen Leukozytenhäufchen herangezogen.

Von 100 Milchproben waren diese Leukozytenhäufchen in Vollmilch in 87 Fällen enthalten, davon betrafen 32 Fälle Viertelsmilchen und 55 Fälle Mischmilchproben.

Im Rahm dieser Milchen waren die galtstreptokokkenhaltigen Leukozytenhäufchen in 57 Fällen aufzufinden; davon waren 18 Viertelsmilchproben und 22 Mischmilchproben.

In der Magermilch konnten sie nur in 40 Fällen festgestellt werden, woran 18 Viertelsmilchen und 22 Mischmilchen beteiligt waren.

Im Sedimentausstrich wurden Leukozytenhäufchen 66mal gefunden. 19 Fälle waren Viertelsmilch- und 47 Fälle waren Mischmilchproben.

Am meisten Konglomerate enthielt demnach die Vollmilch. An zweiter Stelle steht der Menge nach das Sediment, während Rahm und Magermilch einen geringeren positiven Befund zeigten.

Leukozytenkonglomerate wurden in 27 Fällen in allen vier Teilen der Untersuchung (Vollmilch, Rahm, Magermilch und Sediment) gefunden.

Davon waren 13 Fälle Viertelsmilchen und 14 bezogen sich auf Mischmilch.

Eine genaue Feststellung konnte wegen vieler Keime bezw. Zellen nicht getroffen werden bei 1 Viertelsmilch und 3 Mischmilchen.

In 5 Fällen konnten im Sediment keine Leukozytenkonglomerate mit eingeschlossenen Streptokokken gefunden werden, während die Untersuchung der dazu gehörigen Vollmilch, des Rahmes und der Magermilch Eiterklümpchen ergab.

Es handelt sich bei den 5 Proben um 1 Viertelsmilch und 4 Mischmilchproben.

In 14 Fällen wurden in Magermilch keine Leukozytenkonglomerate gefunden. Vollmilch, Rahm und Sediment erwiesen sich hierbei als leukozytenkonglomerathaltig.

Von diesen 14 Proben waren 3 Viertelsproben und 11 Mischmilchproben.

2 Mischmilchproben ergaben wegen der vielen Keime im Rahm nur einen ungenauen Befund.

2 Fälle wurden gefunden, in denen der Rahm keine Leukozytenkonglomerate enthielt, während die dazu gehörige Vollmilch, Magermilch und das Sediment positive Befunde zeigten. Es betraf 1 Viertelsmilch und 1 Mischmilch.

1 Viertelsmilch und 3 Mischmilchen mußten wieder wegen der vielen Keime bezw. Zellen als unsicher gelten.

Es war keine Milchprobe vorhanden, in der, wenn Rahm, Magermilch und Sediment Leukozytengruppen enthielten, nicht auch diese im Vollmilchpräparat nachgewiesen werden konnten.

Nur in einer Milchprobe (Viertelsmilch) wurde das Vorhandensein von Eiterzellgruppen in Voll- und Magermilch bei deren gleichzeitiger Abwesenheit in Rahm und Sediment festgestellt.

In 10 Fällen wurden in Vollmilch und Rahm Leukozytenkonglomerate beobachtet, während sie in Sediment und Magermilch nicht zu finden waren.

Diese 10 Fälle verteilen sich auf 7 Viertelsproben und 3 Mischmilchproben.

Als unsicher mußten 3 Fälle angenommen werden, da eine Zählung bezw. Feststellung von Leukozytenkonglomeraten im Rahm wegen der massenhaft anwesenden Leukozyten unmöglich war.

Es handelt sich dabei um 3 Viertelsmilchen.

In Rahm und Magermilch bei zugleich freier Vollmilch und freiem Sediment wurden Leukozytenkonglomerate mit Streptokokken nie gefunden.

12mal wurden Leukozytenkonglomerate nur in Vollmilch und im Sediment gefunden, während Rahm und Magermilch sich als frei von solchen Gebilden erwiesen. Alle diese Fälle betrafen nur Mischmilch.

Wegen der vielen Verunreinigungskeime konnte bei 2 Mischmilchen eine Entscheidung nicht getroffen werden.

In Rahm und Sediment allein wurden Leukozytenkonglomerate nicht gefunden.

Nur in Magermilch und Sediment kamen Leukozytenkonglomerate in 1 Fall zum Vorschein (Viertelsmilch). Die dazu gehörige Vollmilch und der Rahm erwiesen sich bei der Untersuchung als leukozytenkonglomeratfrei.

In 7 Fällen konnten nur in der Vollmilch Leukozytenkonglomerate gefunden werden. Es sind dies 2 Viertelsproben und 5 Mischmilchproben.

In 3 Fällen (Viertelsmilchen) konnte wegen der großen Leukozytenzahl im Rahm eine einwandfreie Diagnose nicht gestellt werden.

Nur im Rahm wurden Leukozytenhäufchen lediglich in 1 Fall beobachtet. Es handelt sich dabei um Mischmilch.

Allein in der Magermilch kamen die Häufchen nicht vor.

Im Sediment kamen in 4 Fällen, in denen bei Vollmilch, Rahm und Magermilch die Häufchen fehlten, diese zur Beobachtung.

Es sind dies lauter Mischmilchproben.

In 7 Fällen (3 Viertelsmilchen und 4 Mischmilchen) wurden überhaupt keine Leukozytenkonglomerate gefunden.

In Fällen, in denen keine Galteiterklümpchen gefunden wurden, wurde nach freiliegenden, charakteristisch gestalteten Galtstreptokokken gesucht um die Diagnose Galteiter sicher zu stellen.

Die folgende Zusammenstellung umfaßt nur Milchen, die überhaupt keine Leukozytenkonglomerate enthielten:

Daß nur isolierte Galtstreptokokken in einer Milch (Vollmilch und Rahm und Magermilch und Sediment) waren, wurde nicht beobachtet.

Ebenso wurde ein Fehlen von isolierten Galtstreptokokken im Sediment bei gleichzeitiger Anwesenheit derselben in Vollmilch, Rahm und Magermilch und Abwesenheit von Konglomeraten nicht gesehen.

In 2 Fällen (Viertelsproben) war die Magermilch frei von isolierten Galtstreptokokken, während Vollmilch, Rahm und Sediment solche enthielten.

Es wurde weiter kein Fall beobachtet, daß die Vollmilch allein keine isolierten Galtstreptokokken enthalten hätte, bezw. daß der Rahm allein frei war von freiliegenden Galterregern.

In 1 Fall (Mischmilch) wurden in Vollmilch und Rahm freie Galtstreptokokken gefunden. In Sediment und Magermilch waren dabei keine Galterreger nachzuweisen.

In Vollmilch und Magermilch allein wurden in keinem Fall isolierte Galtstreptokokken nachgewiesen.

Ebenso verhält sich das Untersuchungsergebnis von Rahm und Magermilch.

Waren in Rahm und Magermilch keine freien Galtstreptokokken enthalten, so fehlten diese auch in Vollmilch und Sediment.

In Sediment und Rahm zusammen wurden in 2 Fällen isolierte Erreger des gelben Galtes festgestellt und zwar in 1 Viertelsmilch und 1 Mischmilch.

In Sediment und Magermilch zugleich wurden freie Galterreger nicht beobachtet; desgleichen nicht in Vollmilch allein.

Im Rahm allein wurde der freie Mastitiserreger 1mal gefunden (Mischmilch), während in Magermilch allein freie Erreger nicht zur Beobachtung kamen.

Im Sediment allein konnten freie Galtstreptokokken 1mal festgestellt werden (Mischmilch).

Die Stellung der Diagnose Galteiter gelang durch Untersuchung von Vollmilch 94mal, Rahm 91mal, Magermilch 42mal und Sediment 96mal.

In den Fällen, in denen in der Vollmilch der Erreger nicht gefunden werden konnte, führte in 1 Fall (Mischmilch) die Untersuchung des Sediments und in 1 Fall (Mischmilch) die Untersuchung des Rahmes zum Ziel. In 4 Fällen (1 Viertels- und 3 Mischmilchen) wurde die Diagnose durch die Untersuchung von Sediment und Rahm gesichert.

In den 4 Fällen, in denen im Sediment kein Galteiter gefunden wurde, entschied 1mal (Mischmilch) die Untersuchung der Vollmilch, 1mal (Mischmilch) die Untersuchung des Rahmes, 2mal (Mischmilchen) war der Erreger sowohl in Vollmilch, als auch im Rahm zu finden.

Das Zahlenverhältnis der nicht verklumpten Zellen in Vollmilch, Rahm und Magermilch ist fast in sämtlichen Milchproben gleich gewesen:

Am meisten Zellen waren mit Ausnahme einer Viertelsmilch stets im Rahm enthalten.

Nächst dem Rahm zeigte die Vollmilch den höchsten Zellbefund.

In 6 Fällen (1 Einzelmilch und 5 Mischmilchen) waren im Magermilchpräparat keine freien Zellen aufzufinden.

In jenen Fällen, in denen die Eiterzellen nicht verklumpen, kann die Untersuchung auf Galteiter bei Durchmusterung des Präparats mit schwacher Vergrößerung Fehlresultate ergeben. Sind die einzelnen Zellen infolge der Entzündung stark vermehrt, so fällt dies auch bei der Untersuchung mit schwacher Vergrößerung auf. Die Kerne der zahlreichen Zellen erscheinen dann im Präparat als gleichmäßig verteilte, disseminierte Einzelpunkte, ein Bild, das auch die Kolostralmilch bietet.

Im übrigen ergibt sich, daß die Zahl der einzelliegenden Zellen in den verschiedenen Bestandteilen der Milch stets schwankt. Starre Grenzwerte gibt es weder für diese, noch für Streptokokken, noch für die übrigen Befunde.

Zusammenfassung.

I. Zur direkten Bestimmung des Keimgehaltes der Milch sind im Schrifttum drei Verfahren als gebräuchlich angegeben, nämlich:

1. die Methode Breed-Demeter,
2. die Methode nach Skar und
3. die Sedimentausstrichmethode.

Die Breed'sche Methode gilt als einfach und ist auch nach meinen eigenen Erfahrungen sehr rasch zum Ziele führend.

Das Skar'sche Verfahren wird hinsichtlich der Genauigkeit der Methode Breed als gleichwertig erachtet, ist aber zeitraubender, da die gefärbten Proben im Wasserbad erhitzt werden müssen.

Das Sedimentausstrichverfahren wird insoferne als umständlicher angesehen, als die Milch zur Gewinnung des Bodensatzes zentrifugiert werden muß. Sie wird als Schätzmethode hinsichtlich Genauigkeit den beiden anderen Verfahren hintangestellt.

II. Stellt man den Keimgehalt der Vollmilch nach Breed-Demeter fest, so hat man dabei die Möglichkeit die Milch auf Galteiter zu prüfen, ein Umstand, der im Hinblick auf die Bestimmungen der Ausführungsvorschrift zum Milchgesetz nicht nur für den Tierarzt, sondern auch für den Milcherzeuger, Be- und Verarbeiter sowie für den Händler wichtig ist.

In 100 nach dem Breed'schen Verfahren untersuchten galteiterhaltigen Proben konnte ich 94mal den Galteiter nachweisen. Bei der mikroskopischen Prüfung des nach dem Trommsdorff'schen Verfahren gewonnenen Sediments gelang der Nachweis in 96 Fällen.

III. Verfährt man nach dem Vorgehen von Rühm und durchmustert die Präparate zuvor mit schwacher Vergrößerung (1:50), so bekommt man sehr rasch einen gesamten Überblick über die Beschaffenheit der Milch; Schmutzteilchen, Kolonien und Galteiter werden rasch aufgefunden.

IV. Für den praktischen Tierarzt ergibt sich, daß er, falls er nicht im Besitze einer Zentrifuge ist, mit Hilfe des Mikroskops auf einfache Weise Galteiter in der Vollmilch mit annähernd gleicher Sicherheit wie mit dem Sedimentverfahren nachweisen kann.

Handelt es sich nicht um die Keimzahlbestimmungen an sich, so kann der Ausstrich einer größeren Menge Milch auf eine beliebig große Fläche erfolgen. Je mehr Milch ausgestrichen wird, desto größer wird die Sicherheit des Untersuchungsergebnisses.

(Die tabellarisch zusammengefaßten Ergebnisse liegen der Originalarbeit bei.)

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht dem Vorstand des Milchamtes der Stadt München, Herrn Veterinärrat G. Rühm für die Überweisung der Arbeit und die Unterstützung während der Anfertigung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

1. Backhaus und Cronheim. Zit. nach Severin (33).
2. Bergey. Source and nature of bacteria in Milk. Dep. of Agricult. Bull. Nr. 125. Commonwealth of Pennsylvania 1904.
3. Boysen. Gewinnung und Kontrolle der Trinkmilch. Verlag: Molkereizeitung Hildesheim 1929.
4. Breed. The Determination of the Number of Bacteria in Milk by direct mikroskopical Examination. Zentralbl. f. Bakt. II, 30, 1911.
5. Demeter. Bakteriolog. Milchkontrolle. Nachr. Bl. der Vereinigung der Deutschen Milchgroßbetriebe Deutschlands e. V. Dresden. 1. Februar 1929.
6. Ernst. Grundriß der Milchhygiene. Verlag Enke 1926.
7. Ernst. Über Milchstreptokokken und Streptokokkenmastitis. Monatshefte f. Tierheilk. 20, 1909.
8. Fries Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmenge in Bakteriensuspensionen. Zentralbl. f. Bakt. I, 86, 1921.
9. Frost. Zit. nach Klein (14).
10. Gminder. Untersuchungen über Mastitis-Streptokokken und ihre Differenzierung von saprophytischen Streptokokken. Zentralbl. f. Bakt. I, 63, 1912.
11. Hehewert. Die mikroskop. Zählmethode von Alex Klein und einige Anwendungen derselben. Archiv f. Hyg. 39, 1901.
12. Herr und Beninde. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankheiten 38, 1911.
13. Jensen. Die Theorie der Auf- und Entrahmung. Milchwirtsch. Zentralbl. f. Bakt. Bd. 41, 1912.
14. Klein. Die Methoden der Keimzählung. Handbuch der pathog. Mikroorganismen 3. Aufl. herausgegeb. von Kolle — Kraus — Uhlenhuth. Bd. 10.
15. Klein Eine neue mikroskopische Zählmethode. Zentralbl. f. Bakt. I, 27, 1900.
16. Klimmer. Tierärztliche Milchkontrolle, Milchkunde 1932.
17. Lafar. Technische Mykologie. Gust. Fischer-Jena 1904—1906.
18. Lederer. Über die Natur der zelligen Elemente in der Milch. Milchw. Zentralbl. 41, 263, 1912.
19. Lentzen. Zit. nach Skar (34).
20. Liebreich. Eine Zählkammer für cytologische und bakteriologische Zwecke. D. m.W. 1916.
21. Niedestadt. Zit. nach Severin (33).
22. Roht. Zit. nach Severin (33).
23. Rüdiger, Mayr, Wurster. Die Erkennung von Eutererkrankungen. Milchwirtschaftl. Forschungen, 9, 472, 1930.
24. Rühm. Untersuchungen über das Vorkommen und die Häufigkeit der Streptokokkenmastitis bei Kühen. Wochenschr. f. Tierheilk. und Tierz. 147, 1908.
25. Rühm. Die Milchleukozytenprobe nach Trommsdorff. Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhygiene 1909.
26. Rullmann und Trommsdorff. Milchhygienische Untersuchungen. Archiv f. Hyg. 59, 1906.
27. Russels. Zit. nach Severin (33).
28. Scheurlen. Über die Wirkung des Zentrifugierens auf Bakteriensuspensionen, besonders auf die Verteilung der Bakterien in der Milch. Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt 7, 1891.
29. Scholz. Untersuchungen der Milch der 4 Euterviertel beim Rind. Zentralbl. f. Bakt. und Paraskd. 2, 1905.

30. Schumann und Lorenzen. Bericht über einen Großversuch zur Bekämpfung der Streptokokkenmastitis. Landwirtschaftl. Jahrbücher, Bd. 78, Heft 3, 1933.
31. Seelemann. Die Streptokokkeninfektionen des Euters, insbesondere der gelbe Galt. Schaper, Hannover 1932.
32. Seiffert. Über Milchschmutz und seine Bekämpfung. Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhygiene 19, 1909.
33. Severin. Vermindert die Zentrifugierung die Bakterienzahl in der Milch? Zentralbl. f. Bakt. 2, 14, 1905.
34. Skar. Eine schnelle und genaue Methode zur Zählung von Bakterien und Leukozyten. Milchwirtschaftl. Zentralbl. Bd. 41, 454, 1912.
35. Sommer. Bestimmung der Keimzahl in bakteriellen Impfstoffen auf mikroskopischem Wege. Zentralbl. f. Bakt. I, 90, 1913.
36. Sommerfeld. Zit nach Klein (14).
37. Steck. Latente Infektion der Milchdrüse. Schaper, Hannover 1930.
38. Troester. Ein Verfahren zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. Zentralbl. f. Bakt. I, 88, 1922.
39. Trommsdorff. Neue Methode zur Diagnose der chronischen, speziell der Streptokokken-Mastitis der Kuh. Berl. Tierärztl. W. 281, 1906.
40. Trommsdorff. Zur Leukozyten- u. Streptokokkenfrage der Milch. B.T.W. 80, 1909.
41. Wamöscher. Bakterienzählung im Dunkelfeld. Klin. Wochenschr. 1927.
42. Wilkens. Zit. nach Severin (33).
43. Winterberg. Methodik der Bakterienzählung. Zeitschr. f. Hyg 29, 1898.
44. Wright. Zit. nach Kraus — Levaditi I. Gustav Fischer, Jena 1908.
45. Zaribnicky. Tierärztliche Milchuntersuchungen von Viertelmilchproben bei verschiedenen Euterkrankheiten. Zeitschr. f. Fleisch- und Milchhygiene 39, 1929.

Lebenslauf.

Am 18. September 1908 wurde ich, Alois Zenz, zu München als Sohn des damaligen Brauereitechnikers Josef Zenz und seiner Ehefrau Berta, geb. Ascher, geboren.

Im März 1928 schloß ich mein Mittelschulstudium am Wittelsbacher Gymnasium, Realgymnasiale Abteilung, in München ab. Anschließend widmete ich mich dem tierärztlichen Studium an der tierärztlichen Fakultät der Universität München, wo ich am 9. Januar 1933 die Approbation als Tierarzt erhielt. Ab Januar 1933 war ich zunächst während drei Monaten am Schlacht- und Viehhof München als Praktikant und anschließend bei Herrn Bezirkstierarzt Dr. Knapp in Fürstenfeldbruck tätig. Während meiner Tätigkeit am Schlacht- und Viehhof München war ich am Milchamt der Stadt München mit der Anfertigung vorliegender Arbeit beschäftigt.

Seit Ende November 1933 bin ich an der Veterinärpolizeilichen Anstalt in Schleißheim als Praktikant im staatlichen Vorbereitungsdienst tätig.

Februar 1934.